


DAO (Diamine Oxidase) REA

Call 800-592-5726 or [Request Information](#)

 For Research Use Only

Sample Type: serum, plasma


Sample Size: 100 µl

Size: 100 tests

Range: 2.1 - 80 U/ml

Sensitivity: 0.2 U/ml

Incubation Time: 2 hour(s) 30 min(s)

Protocol:  [DAO \(Diamine Oxidase\) REA](#)

International Distribution: Only available in North America

Price/Order:

[Buy Now](#)

[Price](#)

Availability: [Please Order In Advance](#)

Please call or email ALPCO
in advance for availability
800-592-5726



Related Products:

➤ [Histamine ELISA](#)
➤ [Hemoglobin / Haptoglobin ELISA](#)
➤ [S100A12 ELISA](#)

This item appears in: ➤ [Gastroenterology](#)

Summary:

Diamine oxidase (DAO) is a body's own enzyme that metabolizes histamine. Although DAO is found practically in the whole body, the most important site of its action is the intestine. The enzymatic activity of DAO determines the histamine degradation speed. In the case of DAO deficiency or inhibition, incorporated or endogenous histamine cannot be degraded quickly enough, and the symptoms of histamine intolerance are presented. Millions of people suffer from gastrointestinal problems, migraine, irritations of nasal mucosa and other allergy-like symptoms after consumption of certain nutrients. Too much histamine in the body can be the reason for this wide range of symptoms. Another possibility for reduced DAO function could be the intake of activity-inhibiting substances, such as alcohol or medication. Histamine induced food intolerance is not IgE-mediated. Determination of the DAO activity in serum or plasma is a suitable marker for diagnosis of histamine intolerance and the associated symptoms.

The described Radioextractionassay (REA) is intended for the quantitative determination of diamine oxidase activity in serum and plasma.

[Copyright © 2009 ALPCO Diagnostics](#) | [26-G Keewaydin Drive](#) | [Salem, NH 03079](#) | [Toll Free: 800-592-5726](#) | [Fax: 603-812-5726](#)
[Terms of Sale](#) | [Site Map](#) | [Feedback](#) | [Employee Login](#) | [Distributor Login](#)



[36design.com](#)

DAO ELISA

Zur in vitro Bestimmung von Diaminoxidase (DAO) in Serum und Plasma

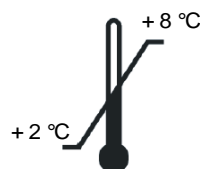
DAO ELISA

For the in vitro determination of DAO in serum and plasma

Gültig ab/valid from 28.10.2010



K 8500



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Dieser ELISA Test ist für die quantitative Bestimmung von Diaminoxidase (DAO) in Serum und Plasma geeignet.

2. EINLEITUNG

Die Diaminoxidase (DAO) ist das entscheidende, körpereigene Abbauenzym für Histamin. Obwohl DAO praktisch im gesamten Körper vorkommt, ist der Darm ihr wichtigster Wirkungsort. Die enzymatische Aktivität der DAO bestimmt die Abbaugeschwindigkeit des Histamins. Liegt ein DAO-Mangel bzw. eine -Hemmung vor, kann der Organismus mit der Nahrung aufgenommenes oder aus körpereigenen Zellen freigesetztes Histamin nicht rasch genug abbauen und es treten die Symptome einer Histamin-Intoleranz auf. Millionen von Menschen leiden nach dem Genuss bestimmter Nahrungsmittel unter Beschwerden wie Magen-Darm-Problemen, Migräne, Reizungen der Nasenschleimhaut, sowie anderen allergieähnlichen Symptomen. Zuviel Histamin im Körper kann für dieses umfangreiche Beschwerdebild verantwortlich sein.

Eine Bestimmung der DAO-Konzentration in Serum und Plasma stellt somit den geeigneten Marker für die Diagnostik der Histamin-Intoleranz und damit assoziierter Krankheitsbilder dar.

Unser DAO-ELISA bestimmt die Konzentration der Diaminoxidase in Serum und Plasma.

Indikationen

- Häufige Kopfschmerzen oder Migräne
- Schnupfen nach dem Genuss histaminhaltiger Nahrungsmittel
- Gewebeödeme
- Schwellung der Augenlider
- Hautrötungen
- Gliederschmerzen
- Magen-Darm-Beschwerden
- Überwachung einer histaminfreien Diät

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 8500MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 8500WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 8500ST	STD	Standards, lyophilisiert (Konzentrationsangabe der Spezifikation entnehmen)	4 x 7 vials
K 8500KO1	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500KO2	CTRL	Kontrolle, lyophilisiert (Konzentrationsbereich der Spezifikation entnehmen)	4 x 1 vial
K 8500A2	AB	Detektionsantikörper (biotinyliert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500K	CONJ	Konjugat (Streptavidin Peroxidase markiert), Konzentrat	1 x 200 µl
K 8500SV	STDBUF	Standardverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 8500PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 8500TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8500AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Laborübliche Reaktionsgefäße aus Polypropylen (1.5 ml)
- Laborübliches Reaktionsgefäß (15 ml)
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Vortex-Mixer
- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Inkubator bei 37°C mit Schüttelfunktion
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das WASHBUF (Pufferkonzentrat) kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die lyophilisierten **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar. Die **STD** (Standards) und die **CTRL** (Kontrollen) werden mit **500 µl** STDBUF (Standardverdünnungspuffer) rekonstituiert und zum Lösen 10 Minuten stehen gelassen. Rekonstituierte Standards können **nicht** gelagert werden.
- Der **AB** (Detektionsantikörper, biotinyliert) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl AB + 10 ml Waschpuffer). Unverdünnter AB ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Verdünnter Antikörper kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Das **CONJ** (Konjugat, POD-markiert) wird **1:101** in Waschpuffer verdünnt (z.B. 100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Unverdünntes CONJ ist bei **2-8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Verdünntes Konjugat ist nicht stabil und kann **nicht** aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Serum / Plasma

25 µl frische Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettieren, mit **225 µl SAMPLEBUF** (Probenverdünnungspuffer) versetzen und gut mischen (entspricht einer **1:10 Verdünnung**).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der "Sandwich"-ELISA Technik. Es werden polyklonale Antikörper, die gegen die rekombinante DAO generiert wurden, verwendet.

Standards, Kontrolle und verdünnte Patientenproben, die auf DAO zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Kaninchen anti-DAO Antikörper beschichtet sind. In diesem ersten Inkubationsschritt wird DAO aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann ein polyklonaler mit Biotin markierter anti-DAO Antikörper, zugegeben. Der nächste Schritt ist die Zugabe des Streptavidin-POD-Konjugats und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – DAO –biotinylierter Antikörper- - Streptavidin-POD-Konjugat

Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem DAO-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen
2.	Positionen für STD (Standard)/ PROBE / CTRL (Kontrollen) in Doppelbestimmung am Protokollblatt markieren
3.	Benötigte PLATE (Mikrotiterstreifen) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.
4.	Mikrotiterstreifen 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
5.	100 µl STD /PROBE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 2 Stunden bei 37° C unter Schütteln inkubieren
7.	Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
8.	100 µl AB (Detektionsantikörper /2.Antikörper) in alle Wells pipettieren
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37° C unter Schütteln inkubieren

10. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. 100 µl CONJ (Konjugat) in alle Wells pipettieren
12. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37° C unter Schütteln inkubieren
13. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. 100 µl SUB (Substrat) in alle Wells pipettieren
15. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
16. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells pipettieren, mischen
17. Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Proben

Die ermittelte DAO Konzentration wird mit Faktor **10** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen DAO Konzentrationen, die außerhalb der Standardkurve liegen, werden mit SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer) stärker verdünnt und nochmals analysiert.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

Normbereich

< 3 U/ml:	HIT (Histaminintoleranz) anzunehmen
3 - 10 U/ml:	HIT wahrscheinlich
> 10 U/ml:	HIT wenig wahrscheinlich

Normbereich aus: Jarisch R et al. (1999)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben innerhalb einer Messserie wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden 16 mal in einem DAO ELISA von einer Person angesetzt.

Intra-Assay VK n= 16

Probe	DAO [U/ml]	Intra-Assay Vk [%]
1	5,0	1,42
2	5,9	1,72

Die Reproduzierbarkeit von zwei Proben an wurde geprüft. Zwei Normalproben wurden an drei verschiedenen Tagen von verschiedenen Personen im DAO ELISA gemessen.

Inter-Assay VK n= 8

Probe	DAO [U/ml]	Inter-Assay Vk [%]
1	23,27	7,9
2	13,36	10,7

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 3 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20 mal der Standard Null.

Nachweisgrenze $n=20$

Probe	Mittelwert [OD]	Standardabweichung	Nachweisgrenze [U/ml]
1	0,019	0,0036	0,52

Linearität

Zwei Proben unterschiedlicher Konzentrationen wurden auf Verdünnungsgerechtigkeit überprüft.

Linearität $n= 2$

Probe	Verdünnung	Erwartet [U/ml]	Gemessen [U/ml]
A	unverdünnt	15,65	15,65
	1:10	7,83	7,68
	1:20	3,92	3,86
	1:40	1,96	1,86
B	unverdünnt	5,58	5,58
	1:10	2,79	2,89
	1:20	1,39	1,45
	1:40	0,7	0,7

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). Agents and Actions 23:361-65.
2. Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. Scand J Clin Lab Invest 24:163-68.
3. Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. Inflammation Research 48:169-70.
4. Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model für food intolerance. Allergy Proceedings 15:27-32.
5. Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. Inflammation Research 47:396-400.
6. Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): The Atopy Syndrome in the Third Millennium. Curr Probl Dermatol, Basel, Karger, 28:64-73.
7. Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches Clin Exp Allergy 23: 982-85.
8. Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel Allergologie 9: 426-30.
9. Jarisch R (1999) Histamin Intoleranz. Stuttgart, Thieme

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

Manual

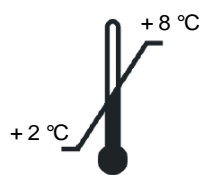
DAO ELISA

For the in vitro determination of DAO in serum and plasma

Valid from 28.10.2010



K 8500



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of diamine oxidase (DAO) in serum and plasma.

2. INTRODUCTION

Diamine oxidase (DAO) is a body's own enzyme that metabolizes histamine. Although DAO is found practically in the whole body, the most important site of its action is the intestine. The enzymatic activity of DAO determines the histamine degradation speed. In the case of DAO deficiency or inhibition, incorporated or endogenous histamine cannot be degraded quickly enough, and the symptoms of histamine intolerance are presented. Millions of people suffer from gastrointestinal problems, migraine, irritations of nasal mucosa and other allergy-like symptoms after consumption of certain nutrients. Too much histamine in the body can be the reason for this wide range of symptoms.

Determination of the DAO concentration in serum and plasma is a suitable marker for diagnosis of histamine intolerance and associated symptoms.

Our DAO-ELISA kit is intended for determination of the diamine oxidase (DAO) concentration in serum and plasma.

Indications

- Frequent headaches or migraine
- Snuffles after consumption of histamine-containing nutrients
- Tissue oedema
- Eyelid turgor
- Skin redness
- Limb aches
- Gastrointestinal discomfort
- Monitoring of a histamine free diet

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8500MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 8500WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 100 ml
K 8500ST	STD	Standards, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 7 vials
K 8500KO1	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500KO2	CTRL	Control, lyophilized (see specification for concentration range)	4 x 1 vial
K 8500A2	AB	Detection antibody, (biotinylated), concentrate	1 x 200 µl
K 8500K	CONJ	Conjugate, (streptavidin peroxidase labeled), concentrate	1 x 200 µl
K 8500SV	STDBUF	Standard dilution buffer, ready to use	1 x 25 ml
K 8500PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready to use	1 x 50 ml
K 8500TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	1 x 15 ml
K 8500AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Standard laboratory reaction vessels (1.5 ml)
- Standard laboratory reaction vessel (15 ml)
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Vortex mixer
- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Shaking incubator at 37°C
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution. The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month**.
- The lyophilized **STD** (standards) and **CTRL** (controls) are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. The **STD** (standards) and **CTRL** (controls) must be reconstituted with **500 µl STDBUF** (standard dilution buffer). Allow the vial content to dissolve for 10 minutes and mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. Reconstituted standards are **not stable**.
- The **AB** (detection antibody, biotinylated) must be diluted **1:101** in wash buffer (e.g. 100 µl AB + 10 ml wash buffer). The undiluted AB is stable at **2-8 °C** until the expiry date given on the label. Diluted antibody solution is **not stable** and can not be stored.
- The **CONJ** (conjugate, POD-antibody) must be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The undiluted CONJ is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. Diluted conjugate is **not stable** and can not be stored.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum / Plasma

Pipet **25 µl** of fresh sample in a 1,5 ml reaction vial, add **225 µl SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) and mix well (corresponds to **1:10 dilution**).

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the “sandwich” technique with two polyclonal antibodies against recombinant DAO.

Standards, control and diluted samples which are assayed for DAO are added into the wells of a micro plate coated with polyclonal rabbit anti-DAO antibody. During the first incubation step, DAO is bound by the immobilized primary antibody. Then a biotinylated polyclonal anti-DAO antibody, is added into each microtiter well. In the next step, the streptavidin-POD-conjugate is added and a “sandwich” of

1st antibody – DAO - biotinylated antibody – streptavidin-POD-conjugate

is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction. The colour changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of DAO. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature and mix by gentle swirling and inversion.
2.	Mark the positions of STD (Standards)/ SAMPLE/CTRL (Controls) in duplicate on a protocol sheet
3.	Take PLATE (microtiter strips) out of the kit. Store unused strips in the original package bag at 2-8° C. Strips are stable until expiry date stated on the label
4.	Wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
5.	Add 100 µl of STD (Standards)/ SAMPLE/CTRL (Controls) in duplicate into respective well
6.	Cover the plate tightly and incubate for 2 hours at 37° C on a horizontal mixer
7.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
8.	Add 100 µl of AB (Detection antibody, 2nd Antibody) into each wells mix gently
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37° C on a horizontal mixer

10.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
11.	Add 100 µl of CONJ (Conjugate) into each well
12.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 37° C on a horizontal mixer
13.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. After the last wash, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel
14.	Add 100 µl of SUB (Substrate) into each well
15.	Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark
16.	Add 50 µl of STOP (Stop solution) into each well, shake well
17.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend to observe the colour change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Samples

The obtained DAO concentration must be multiplied by a factor of **10**.

9. LIMITATIONS

Samples with DAO concentrations **outside the standard curve** range should be diluted further with **SAMPLEBUF** (sample dilution buffer) to obtain readings within the standard curve and re-assayed.

10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

Normal range

< 3 U/ml:	high incidence for HIT (Histamine intolerance)
3 - 10 U/ml:	HIT probable
> 10 U/ml:	low incidence for HIT

Normal concentration range: Jarisch R et al. (1999)

It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

The precision (intra-assay variation) was calculated from 16 replicate determinations on each of two samples.

Intra-Assay CV n= 16

Sample	DAO [U/ml]	Intra-Assay CV [%]
1	5.0	1.42
2	5.9	1.72

The total precision (inter-assay variation) was calculated from data on 2 samples obtained in 8 different assays by different technicians on three different days.

Inter-Assay CV n= 8

Sample	DAO [U/ml]	Inter-Assay CV [%]
1	23.27	7.9
2	13.36	10.7

Sensitivity

The sensitivity limit was set as $B_0 + 3 \text{ SD}$. The Zero-standard was measured 20 times.

Sensitivity n=20

Sample	Mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [U/ml]
1	0.019	0.0036	0.52

Sample dilution

Two patient samples were diluted and assayed. The results are shown below:

Linearity n= 2

Sample	Dilution	Expected [U/ml]	Measured [U/ml]
A	undiluted	15,65	15,65
	1:10	7,83	7,68
	1:20	3,92	3,86
	1:40	1,96	1,86
B	undiluted	5,58	5,58
	1:10	2,79	2,89
	1:20	1,39	1,45
	1:40	0,7	0,7

12. PRECAUTIONS

- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colorless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). Agents and Actions 23:361-65.
2. Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. Scand J Clin Lab Invest 24:163-68.
3. Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. Inflammation Research 48:169-70.
4. Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model für food intolerance. Allergy Proceedings 15:27-32.
5. Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. Inflammation Research 47:396-400.
6. Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): The Atopy Syndrome in the Third Millenium. Curr Probl Dermatol, Basel, Karger, 28:64-73.
7. Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches Clin Exp Allergy 23: 982-85.
8. Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel Allergologie 9: 426-30.
9. Jarisch R (1999) Histamin Intoleranz. Stuttgart, Thieme

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number

DAO-REA (^3H)

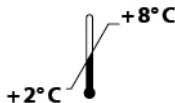
Radioextraktionsassay zur quantitativen Bestimmung von
Diaminoxidase-Aktivität in Serum

Radioextractionassay for the quantitative determination of
diamine oxidase activity in serum

Gültig ab / Valid from 09.06.2008



K 8220



Immundiagnostik AG



For Research Use Only
For Reference Purposes Only

Inhalt

Content 12

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. INHALT DER TESTPACKUNG 3

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 3

5. LAGERUNG DER PROBEN UND REAGENZIEN 4

6. TESTDURCHFÜHRUNG 4

 Testprinzip 4

 Hinweise 4

 Vorbereitung 4

 Pipettierschema 5

7. ERGEBNISSE 6

8. QUALITÄTSKONTROLLE 6

9. TESTCHARAKTERISTIKA 7

 Präzision und Reproduzierbarkeit 7

 Sensitivität 7

 Wiederfindung: 8

10. VORSICHTSMASSNAHMEN 8

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 9

13. LITERATUR 9

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Radioextraktionsassay (REA) ist für die quantitative Bestimmung von Diaminoxidase-Aktivität in Serum geeignet. Nur zur in-vitro-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die **Diaminoxidase (DAO)** ist das entscheidende, körpereigene Abbauenzym für Histamin. Obwohl DAO praktisch im gesamten Körper vorkommt, ist der Darm ihr wichtigster Wirkungsort. Die enzymatische Aktivität der DAO bestimmt die Abbaugeschwindigkeit des Histamins. Liegt ein DAO-Mangel bzw. eine -Hemmung vor, kann der Organismus mit der Nahrung aufgenommenes oder aus körpereigenen Zellen freigesetztes Histamin nicht rasch genug abbauen und es treten die Symptome einer Histamin-Intoleranz auf. Millionen von Menschen leiden nach dem Genuss bestimmter Nahrungsmittel unter Beschwerden wie Magen-Darm-Problemen, Migräne, Reizungen der Nasenschleimhaut, sowie anderen allergie-ähnlichen Symptomen. Zuviel Histamin im Körper kann für dieses umfangreiche Beschwerdebild verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit einer verminderten DAO-Funktion ist die Aufnahme aktivitätshemmender Substanzen wie Alkohol oder Medikamente.

Die histamininduzierte Nahrungsmittel-Intoleranz ist nicht IgE-vermittelt. Eine Bestimmung der DAO-Aktivität in Serum stellt somit den geeigneten Marker für die Diagnostik der Histamin-Intoleranz und damit assoziierter Krankheitsbilder dar.

Mit unserem **DAO-REA** wird die Menge an biologisch aktiver Diaminoxidase in der Zirkulation ermittelt. Das Probenvolumen beträgt 100 µl Serum. Ergebnisse liegen nach 3 Stunden vor.

Indikationen:

- Nachweis einer Histaminintoleranz
- Überwachung einer histaminfreien Diät

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K8220ST	STD	Standards mit Diaminoxidase-Lösung aus Schweineniere, lyophilisiert	1 ml
K8220KO	CTRL	Diaminoxidase-Lösung aus Schweineniere, lyophilisiert	1 ml
K8220AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	15 ml
K8220SUB	SUB	Radioaktives Putrescindihydrochlorid in einer stabilisierten Lösung, gebrauchsfertig	5,5 ml
K8220EXT	EXTSOL	Extraktionslösung, gebrauchsfertig	105 ml
K8220SZI	SZIN	Aquasafe Szintillator, gebrauchsfertig	105 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Verschließbare Reaktionsgefäße aus Plastik (2 ml)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 μl
- Multikanal- oder Multipipette
- Inkubator (evtl. Schüttler) 37°C
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge
- Szintillationsgefäße
- Beta-Counter
- Software zur Auswertung

5. LAGERUNG DER PROBEN UND REAGENZIEN

- Frisch abgenommene Serumproben sollten nicht länger als 24 Stunden bei Raumtemperatur oder gekühlt (2-8°C) gelagert werden. Für längere Lagerung sind die Proben bei -20°C einzufrieren.
- Es sollten mehr als 3 Auftauzyklen vermieden werden.
- Die rekonstituierten Standards (STD) und die Kontrolle (CTRL) sind 4 Wochen bei 2-8°C stabil.
- Alle Testreagenzien sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf einem Radio-Extraktions-Assay (REA) Prinzip. Die Ermittlung der DAO-Aktivität erfolgt über die Konzentrationsbestimmung eines Reaktionsproduktes. Als Substrat dient radioaktiv markiertes Putrescin. Bei dem Reaktionsprodukt handelt es sich um radioaktives Δ^1 -Pyrrolin. Dieses wird mittels Flüssigphasenextraktion in ein organisches Lösungsmittel überführt. Nach Zugabe von Szintillator wird die Radioaktivität in einem Beta-Counter bestimmt. Die gemessene Menge Radioaktivität ist direkt proportional der DAO-Aktivität der Probe.

Hinweise

- Vor dem Einsatz im Test sind die Proben gut zu mischen.
- Wir empfehlen, alle Werte in Doppelbestimmungen durchzuführen.

Vorbereitung

- Die lyophilisierten Standards (STD) und die Kontrolle (CTRL) werden mit jeweils 1ml dest. H_2O rekonstituiert und 10 min stehen gelassen; anschließend gut vortexen
- Alle Reagenzien und Proben müssen Raumtemperatur (18 - 26°C) haben, bevor sie im Test eingesetzt werden. Reaktionsgefäße für Standards (STD), Kontrolle (CTRL) und Proben vorbereiten und beschriften.

Pipettierschema

100 μl der rekonstituierten Standards (STD) bzw. Kontrolle (CTRL) und die Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren
100 μl Assaypuffer (ASYBUF) in alle Röhrchen zugeben
50 μl Substrat (SUB) in jedes Röhrchen pipettieren
Alle Röhrchen gut schütteln (Vortex-Mischer)
Alle Röhrchen 150 min bei 37°C inkubieren, wenn möglich schütteln
In jedes Röhrchen 1 ml Extraktionslösung (EXTSOL) zugeben, mind. 15 sec. am Vortex gut mischen. Dieser Schritt ist wichtig für eine vollständige Extraktion!
Extraktionsgemisch 1 min bei $>8000 \times g$ zentrifugieren
800 μl der oberen (organischen) Phase in ein Szintillationsgefäß überführen (Alternative Abarbeitungsmethode siehe *)
1 ml Szintillator (SZIN) in jedes Szintillationsgefäß zugeben, gut mischen
Jedes Szintillationsgefäß 1 min. im Beta-Counter zählen

* Alternative Abarbeitungsmethode:

Dekantieren des Überstandes nach dem Zentrifugationsschritt

Durch Inkubation der Reaktionsgefäße bei -20°C für mindestens 90 Minuten gefriert die untere, wässrige (rote) Phase. Hierbei bleibt die obere, organische Phase flüssig und kann so einfach in das Szintillationsgefäß dekantiert werden. Es ist darauf zu achten, dass die untere Phase vollständig durchgefroren und damit der Verbleib im Gefäß gewährleistet ist.

Zu beachten ist, dass geeignete Reaktionsgefäßständer verwendet werden. Styroporständer sind zu vermeiden, oder es ist die Inkubationszeit bei -20°C zu erhöhen. Ein Kunststoff- oder Metallständer, welcher zunächst tiefgefroren wurde kann unter Umständen die notwendige Inkubationszeit von 90 Minuten verringern. In jedem Fall ist darauf zu achten, dass eine konstante Phasentrennung während des Dekantierens gewährleistet ist.

1 ml Szintillator (SZIN) in jedes Szintillationsgefäß zugeben, gut mischen

Jedes Szintillationsgefäß 1 min. im Beta-Counter zählen

7. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für Counts empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die Counts und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die Counts empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,01)

Bei jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden, falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Erwartete Ergebnisse

- < 3 U/ml: HIT anzunehmen
- 3 - 10 U/ml: HIT wahrscheinlich
- > 10 U/ml: HIT wenig wahrscheinlich

Normbereich aus: Jarisch R et al. (1999)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Die Diagnose der Histamin-Intoleranz ist in jedem Falle mit dem aktuellen Wert der Histamin-Konzentration im Serum zu korrelieren.

KEINE DIAGNOSE von Histamin-Intoleranz ist bei anaphylaktischem Schock und Schwangerschaft möglich!

9. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=10)		
Probe	DAO-Aktivität (U/ml)	VK [%]
1	41,5	4,07
2	2,8	6,29
3	27,5	4,78

Inter-Assay (n=5)		
Probe	DAO-Aktivität (U/ml)	VK [%]
1	42,4	5,59
2	2,7	16,16
3	27,4	4,39

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als 0,2 U/ml (B0 + 3 SD). Gemessen wurde 10 mal der Standard 0.

Wiederfindung:

2 Seren wurden mit je 10 U/ml DAO versetzt und im Assay gemessen.

Serum	Ungespiket	Erwartet	Gemessen	Wiederfindung
1	19,1	29,1 U/ml	29,7 U / ml	102,1 %
2	1,5	11,5 U/ml	9,6 U / ml	83,5 %

10. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden. Zusätzlich wird empfohlen eigene Qualitätskontrollen zu messen.
- Während der Handhabung der Reagenzien Handschuhe tragen.
- Radioaktiver Abfall muss gemäß der lokal gültigen Richtlinien entsorgt werden!
- Das eingesetzte Extraktionsmittel muss als organisches, nicht halogeniertes Lösungsmittel gemäß der lokal gültigen Richtlinien entsorgt werden!

11. TECHNISCHE MERKMALE

- Die Extraktionszeit von 15 sec darf nicht unterschritten werden, da sonst die Extraktionsausbeute variieren kann.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Reagenzien nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur in vitro Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipetiertvolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

13. LITERATUR

- Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). Agents and Actions 23:361-65.
- Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. Scand J Clin Lab Invest 24:163-68.
- Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. Inflammation Research 48:169-70.
- Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model for food intolerance. Allergy Proceedings 15:27-32.
- Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. Inflammation Research 47:396-400.
- Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): The Atopy Syndrome in the Third Millennium. Curr Probl Dermatol, Basel, Karger, 28:64-73.
- Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches Clin Exp Allergy 23: 982-85.

- Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel Allergologie 9: 426-30.
- Jarisch R (1999) Histamin Intoleranz. Stuttgart, Thieme

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Radioaktivität

For Research Use Only
For Reference Purposes Only

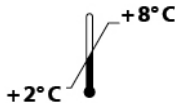
DAO-REA (^3H)

Radioextraction assay for the quantitative determination
of diamine oxidase activity in serum

Valid from 09.06.2008



K 8220



Immundiagnostik AG



Content

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	14
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. STORAGE OF REAGENTS	15
6. ASSAY PROCEDURE	15
Principle of the test	15
Procedural notes	15
Preparation	15
Test procedure	16
7. RESULTS	17
8. QUALITY CONTROL	17
Expected values	17
9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18
Precision and reproducibility	18
Sensitivity	18
Recovery:	19
10. PRECAUTIONS	19
11. TECHNICAL HINTS	19
12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20
13. REFERENCES	20

1. INTENDED USE

The described Radioextractionassay (REA) is intended for the quantitative determination of diamine oxidase activity in serum and plasma. It is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Diamine oxidase (DAO) is a body's own enzyme that metabolizes histamine. Although DAO is found practically in the whole body, the most important site of its action is the intestine. The enzymatic activity of DAO determines the histamine degradation speed. In the case of DAO deficiency or inhibition, incorporated or endogenous histamine cannot be degraded quickly enough, and the symptoms of histamine intolerance are presented. Millions of people suffer from gastrointestinal problems, migraine, irritations of nasal mucosa and other allergy-like symptoms after consumption of certain nutrients. Too much histamine in the body can be the reason for this wide range of symptoms. Another possibility for reduced DAO function could be the intake of activity-inhibiting substances, such as alcohol or medication.

Histamine induced food intolerance is not IgE-mediated. Determination of the DAO activity in serum or plasma is a suitable marker for diagnosis of histamine intolerance and the associated symptoms.

With our easy-to-use, reliable and standardised test kit it is possible to quantify the biological activity of DAO in the circulation. Only 100µl of serum is needed for the test, results are available within 3 hours.

Indications:

- Detection of histamine intolerance
- Monitoring of a histamine-free diet

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No.	Content	Kit Components	Quantity
K8220ST	STD	Standards with diamine oxidase from porcine kidney, lyophilized.	1 ml
K8220KO	CTRL	Diamine oxidase from porcine kidney, lyophilized	1 ml
K8220AP	ASYBUF	assay buffer, ready to use	15 ml
K8220SUB	SUB	radio-labelled putrescine-dihydrochloride in a stabilised solution., ready to use	5,5 ml
K8220EXT	EXTSOL	non-toxic, chlorine free extraction solution, ready to use	105 ml
K8220SZI	SZIN	Aquasafe Liquid Szintillation cocktail, ready to use	105 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Polypropylene-tubes with cap, holding 2 ml
- Pipettes for 50 μl , 100 μl , 800 μl , 1000 μl
- Multichannel or multipette
- Incubator (shaker) 37°C
- Vortex-mix
- Centrifuge
- Liquid szintillation vials
- Beta-Counter
- Software for calculation of results

5. STORAGE OF REAGENTS

- Freshly collected samples may be stored at room temperature or at 2-8°C up to 24 hours. For prolonged storage samples must be frozen at -20°C.
- Avoid more than 3 freeze cycles.
- The reconstituted standards (STD) and the control (CTRL) are stable for 4 weeks at 2-8°C.
- All reagents are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label

6. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

Human serum may be used as an analyte. The activity of the diamine oxidase is determined by quantitating the reaction product. Radiolabelled putrescine-dihydrochloride is used as a substrate. The resulting Δ^1 pyrroline, containing the radiolabel, is extracted selectively from the matrix by a liquid extraction step. A non-toxic, chlorine free solvent with high capacity is used for the extraction.

Finally scintillation fluid is added to the organic phase containing the radiolabelled Δ^1 pyrroline and radioactivity is determined in a beta-counter. The signal is directly proportional to the activity of DAO in the sample.

Procedural notes

- Samples should be mixed well before assaying.
- We recommend duplicates for all values.

Preparation

- The lyophilized standards (STD) and the control (CTRL) must each be reconstituted with 1ml distilled H_2O . Allow the vial content to dissolve for 10 minutes; afterwards vortex well.
- All reagents should have reached room temperature (18°C to 26°C) before use. Prepare and label PP-tubes for standards, control and samples as appropriate.

Test procedure

Pipette 100 μl of reconstituted standards (STD), control (CTRL) and samples into the respective tubes
Add 100 μl of assay buffer (ASYBUF) into all tubes
Add 50 μl of substrate (SUB) to all tubes
Vortex all tubes thoroughly
Incubate all tubes for 150 min at 37°C , shake if possible
Add 1 ml of extraction solution (EXTSOL) into all tubes, mix thoroughly on a vortex mixer for at least 15 seconds This step is essential for a complete extraction!
Centrifuge the extraction mixture for 1 min at $> 3000 \times g$
Transfer 800 μl of the upper phase (organic) into a scintillation vial (Alternative method of running the test, see below *)
Add 1 ml of szintillaton (SZIN) fluid into all szinti-vials, mix well
Count every vial for 1 min in the beta counter

*Alternative method of running the test:

Decantation of the supernatant:

Alternatively the reaction tubes can be incubated at -20°C for at least 90 minutes to freeze the lower (red) phase. The organic supernatant remains liquid and can easily be decanted directly into the scintillation vials. It's necessary that the entire lower phase is frozen to make sure that it completely remains in the tube while decanting the organic phase.

Please avoid the usage of polystyrene tube racks or increase the incubation time at -20°C . Metal or plastic tube racks are recommended. A preincubation of these racks at -20°C can reduce the required incubation time. In any case it is highly recommended to make sure that a constant phase separation is warranted.

Transfer 800 μl of the upper phase (organic) into a scintillation vial
Add 1 ml of szintillaton (SZIN) fluid into all szinti-vials, mix well
Count every vial for 1 min in the beta counter

7. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the „4-Parameter-algorithm“.

1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e.g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline-algorithm

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e.g. 0.01).

8. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Expected values

< 3 U/ml:	high incidence for HIT
3 - 10 U/ml:	HIT probable
> 10 U/ml:	low incidence for HIT

Norm concentration range: Jarisch R et al. (1999)

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

A diagnosis of histamine-intolerance must be correlated to the actual concentration of histamine.
It is IMPOSSIBLE to state histamine intolerance in case of anaphylactic shock and during pregnancy!

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=10)		
Sample	DAO-Activity (U/ml)	VK [%]
1	41,5	4,07
2	2,8	6,29
3	27,5	4,08

Inter-Assay (n=5)		
Sample	DAO-Activity (U/ml)	VK [%]
1	42,4	5,59
2	2,7	16,16
3	27,4	4,39

Sensitivity

The sensitivity was set as 0,2 U/ml (B0 + 3 SD). The zero-standard was measured 10 times.

Recovery:

2 serums were spiked with 10 U/ml DAO and measured with the assay.

Serum	Unspiked	Expected	Measured	Recovery
1	19,1	29,1 U/ml	29,7 U / ml	102,1 %
2	1,5	11,5 U/ml	9,6 U / ml	83,5 %

10. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Radioactive waste must be disposed according to local regulations.
- The extraction solvent is a non-halogenated organic solvent and has to be disposed according to local regulations.

11. TECHNICAL HINTS

- Extraction time must not be shorter than 15 sec as extraction recovery may vary with shorter extraction times.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Do not expose reagents to direct sunlight.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.







12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for in vitro diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

13. REFERENCES

- Sattler J et al. (1988) Food induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). Agents and Actions 23:361-65.
- Tufvesson G et al. (1969) Determination of DAO-activity in normal human blood serum. Scand J Clin Lab Invest 24:163-68.
- Wantke F et al. (1999) The red wine maximization test: drinking histamine rich wine induces a transient increase of plasma diamine oxidase activity in healthy volunteers. Inflammation Research 48:169-70.
- Wantke F et al. (1994) The red wine provocation test: intolerance to histamine as a model für food intolerance. Allergy Proceedings 15:27-32.
- Wantke F et al. (1998) Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. Inflammation Research 47:396-400.
- Jarisch R et al. (1999) Role of food allergy and food intolerance in recurrent urticaria. In: Wüthrich B (Hrsg): The Atopy Syndrome in the Third Millenium. Curr Probl Dermatol, Basel, Karger, 28:64-73.
- Wantke F et al. (1993) Histamine free diet: treatment of choice for histamine induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches Clin Exp Allergy 23: 982-85.
- Götz M et al. (1996) Histamin-Intoleranz und Diaminoxidasemangel Allergologie 9: 426-30.
- Jarisch R (1999) Histamin Intoleranz. Stuttgart, Thieme

Used Symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Radioactivity

For Research Use Only
For Reference Purposes Only

For Research Use Only
For Reference Purposes Only



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com